



1632

1632

PATENT
Customer No. 22,852
Attorney Docket No. 08888.0111-01000

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:)
)
Didier BRANELLEC et al.) Group Art Unit: 1632
)
Application No.: 10/078,677) Examiner: Scott D. Priebe
)
Filed: February 21, 2002)
)
For: GENE THERAPY FOR)
RESTENOSIS USING AN)
ADENOVIRAL VECTOR)

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

SUBMISSION OF CERTIFIED TRANSLATION OF PRIORITY DOCUMENT

Further to the response filed August 29, 2003, Applicants herewith submit an official copy of French patent FR 94/10083 and a certified translation accompanied by a notarized certificate of accuracy by the translator. As discussed in Applicants' August 29, 2003 response, the certified translation establishes that the reference cited by the Office (Steg *et al.* (1994) Circulation 90:1648-1656) is not prior art against the present application.

FINNEGAN
HENDERSON
FARABOW
GARRETT &
DUNNER ^{LLP}

1300 I Street, NW
Washington, DC 20005
202.408.4000
Fax 202.408.4400
www.finnegan.com

Please grant any extensions of time required to enter this response and charge any additional required fees to deposit account 06-0916.

Respectfully submitted,

FINNEGAN, HENDERSON, FARABOW,
GARRETT & DUNNER, L.L.P.

Dated: September 23, 2003

By: _____



Matthew J. Pugmire
Reg. No. 54,723

FINNEGAN
HENDERSON
FARABOW
GARRETT &
DUNNER LLP

1300 I Street, NW
Washington, DC 20005
202.408.4000
Fax 202.408.4400
www.finnegan.com



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 03 SEP. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



REQUÊTE

EN DÉLIVRANCE D'UN
TITRE DE PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE *

a	<input checked="" type="checkbox"/>	BREVET D'INVENTION
b	<input type="checkbox"/>	CERTIFICAT D'UTILITÉ
c	<input type="checkbox"/>	DEMANDE DIVISIONNAIRE
d	<input type="checkbox"/>	TRANSFORMATION D'UNE DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

2 OPTIONS OBLIGATOIRES au moment du dépôt (sauf pour le certificat d'utilité)

LE DEMANDEUR REQUIERT
UN ÉTABLISSEMENT DIFFÉRENT

OUI

☒ NON

LA OPTION CHOISIE EST PRIORITAIRE
SI LE DEMANDEUR EST UNE
PERSONNE PHYSIQUE
RECLAMANT LE PAIEMENT
ÉCHELONNÉ DE LA REDEVANCE
DE RAPPORT DE RECHERCHE

OUI

☒ NON

NATURE NUMÉRO DATE DE LA DEMANDE INITIALE

DATE DE REMISE DES PIÈCES

17. AOÛT 1994

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

94 10083 -

DATE DE DÉPÔT

17.08.94

CODE POSTAL DU LIEU DE DÉPÔT

4 NUMÉRO DU POUVOIR PERMANENT

15 janvier 1991

5 PRÉFÉRENCE DU CORRESPONDANT

ST 94067

6 TÉLÉPHONE DU CORRESPONDANT

40 91 70 36

7 TITRE DE L'INVENTION

MÉTHODE DE TRAITEMENT DE LA RESTENOSE PAR LA THÉRAPIE GÉNÉRIQUE

8 DEMANDEUR(S) Nom et Prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination et forme juridique

RHONE-POULENC RORER S.A.
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
INSTITUT GUSTAVE ROUSSY

9 ADRESSE(S) COMPLÈTE(S)

20, av Raymond Aron, 92160 Antony
3, rue Michel Ange, 75016 Paris
39, rue Camille Desmoulins, 94800 Villejuif

PAYS

FRANCE

10 NATIONALITÉ(S)

Française

11 INVENTEUR(S)

LE DEMANDEUR EST L'UNIQUE
INVENTEUR

OUI

Si la réponse est non voir notice explicative

☒ NON

12

SI LE DEMANDEUR EST UNE PERSONNE
PHYSIQUE NON IMPOSABLE, IL
REQUIERT-IL OU A REQUIS LA RÉDUCTION
DES REDEVANCES

OUI

☒ NON

☒ DE DÉPÔT

REDEVANCES VERSÉES

☒ DE RAPPORT DE RECHERCHE

DE REVENDICATION DE PRIORITÉ

☒ DE REVENDICATION (à partir de la 1^{re})

13 DÉCLARATION DE PRIORITÉ

DU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE

LA DATE DE DÉPÔT D'UNE

DEMANDE ANTÉRIEURE

PAYS D'ORIGINE

DATE DE DÉPÔT

NUMÉRO

14

DIVISIONS

INTERVENIR À LA
PRÉSENTE L'ORDRE

RHONE-POULENC RORER S.A.

Fondé de Pouvoir

Philippe BECKER

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

* Cocher la case choisie

LES ENCADRÉS GRAS SONT RÉSERVÉS À L'ADMINISTRATION

Division Administrative des Brevets

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

ST 94067

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N° d'enregistrement national

94 10083

Titre de l'invention :

METHODE DE TRAITEMENT DE LA RESTENOSE PAR LA THERAPIE GENIQUE

Le (s) soussigné (s)

RHONE-POULENC RORER S.A., 20, av Raymond Aron, 92160 Antony, FRANCE
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE, 3, rue Michel Ange, 75016 Paris,
FRANCE

INSTITUT GUSTAVE ROUSSY, 39, rue Camille Desmoulins, 94800 Villejuif, FRANCE

désigne (nt) en tant qu'inventeur (s) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

BRANELLEC Didier, 1, rue Saint-Benoit, 94210 La Varenne - Saint-Hilaire,
FRANCE

DEDIEU Jean-François, 84, quai de Jemmapes, 75010 Paris, FRANCE

DENEFFLE Patrice, 45, av des Fusillés de Chateaubriand, 94100 Saint-Maur,
FRANCE

FELDMAN Laurent, 8, rue de la Neva, 75017 Paris, FRANCE

PERRICAUDET Michel, 31, rue de Chartres, 28320 Ecrosnes, FRANCE

STEG Gabriel, 93, rue Jouffroy, 75017 Paris, FRANCE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire Antony, le 17 août 1994

RHONE-POULENC RORER S.A.
Fondé de Pouvoir

Philippe BECKER

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDI- CATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
14	15		2	11/01/95	18 JAN. 1995 C J
14			X	24/07/95	11 AVR. 1996 - O L

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article 28 du décret du 19 septembre 1979, est signalé par la mention "R.M." (revendications modifiées).

BT 244 / 171180

METHODE DE TRAITEMENT DE LA RESTENOSE PAR
LA THERAPIE GENIQUE

La présente invention concerne une méthode pour le traitement de la resténose par la thérapie génique, comprenant l'administration d'un adénovirus recombinant comportant un gène suicide. Elle concerne également des compositions pharmaceutiques particulières permettant l'administration locale et efficace des virus recombinants.

L'athérosclérose est une maladie complexe, polygénique, qui est définie sur le plan histologique par des dépôts (plaques lipidiques ou fibro-lipidiques) de lipides et d'autres dérivés sanguins dans la paroi des grosses artères (aorte, artères coronaires, carotide). Ces plaques, plus ou moins calcifiées selon l'avancement du processus, peuvent être jumelées à des lésions et sont liées à l'accumulation dans les artères de dépôts gras constitués essentiellement d'esters de cholestérol. Ces plaques s'accompagnent d'un épaissement de la paroi artérielle, avec hypertrophie du muscle lisse, apparition de cellules spumeuses et accumulation de tissu fibreux. La plaque athéromateuse est très nettement en relief sur la paroi, ce qui lui confère un caractère sténosant responsable des occlusions vasculaires par athérome, thrombose ou embolie qui surviennent chez les patients les plus atteints. Ces lésions peuvent donc conduire à des pathologies cardio-vasculaires très graves telles que l'infarctus, la mort subite, l'insuffisance cardiaque, les accidents cérébro-vasculaires, etc.

Depuis 1977, la technique d'angioplastie a été développée pour permettre une intervention non chirurgicale au niveau de la plaque d'athérosclérose. Cependant, le traitement d'une lésion athéromateuse par angioplastie résulte de façon très fréquente (jusqu'à 50% des cas dans certaines études) en une resténose consécutive à la blessure mécanique de la paroi artérielle. Un événement clef de ce mécanisme est la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) de la média vers l'intima, notamment du fait de l'absence de protection et/ou de rétrocontrôle exercé par les cellules endothéliales de l'intima.

Le traitement de la resténose par administration de substances chimiques ou protéiques capables de tuer les cellules musculaires lisses vasculaires a été proposé dans l'art antérieur. Ainsi, des dérivés de psoralènes, incorporés par les cellules prolifératives et sensibilisant alors ces cellules à l'action de la lumière, ont été utilisés (March et al, 1993, circulation, 87:184-191). De même, certaines cytotoxines

constituées d'une protéine de fusion entre un fragment de toxine de plante ou bactérienne et un facteur de croissance ont également été utilisées (Pickering et al, J. Clin. Invest., 1993, 91:724-729; Biro et al, 1992, Circ. Res., 71:640-645; Casscells et al, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1992, 89:7159-7163). Cependant, ces traitements
5 présentent de nombreux inconvénients, tels que leur faible spécificité, leur efficacité moyenne, un délai d'action important et une toxicité potentielle.

La présente invention apporte une solution avantageuse à ce problème. La présente invention fournit en effet une méthode particulièrement efficace et sélective pour le traitement de la resténose post-angioplastie par la thérapie génique. La
10 méthode de la présente invention consiste principalement à administrer un adénovirus recombinant comportant un gène suicide, capable de sensibiliser spécifiquement les cellules musculaires lisses vasculaires en prolifération à un agent thérapeutique. L'administration simultanée ou subséquente de cet agent thérapeutique entraîne alors la mort sélective des cellules sensibilisées.

15 Les avantages de la présente invention résident notamment dans la forte capacité des adénovirus de l'invention à infecter les cellules musculaires lisses vasculaires en prolifération. Ceci permet d'utiliser des quantités relativement faibles de principe actif (adénovirus recombinant), et permet également une action efficace et très rapide sur les sites à traiter. Les adénovirus de l'invention sont également capables
20 d'exprimer à très hauts niveaux les gènes suicides introduits, ce qui leur confère une action thérapeutique très efficace. De plus, en raison de leur caractère épisomal, les adénovirus de l'invention ont une persistance limitée dans les cellules prolifératives et donc un effet transitoire parfaitement adapté à l'effet thérapeutique recherché. Enfin, la demanderesse a également mis au point une méthode d'administration particulièrement
25 avantageuse qui permet d'infecter avec une grande efficacité certaines cellules cibles essentielles à l'effet thérapeutique recherché.

Un premier objet de l'invention concerne donc l'utilisation d'un adénovirus recombinant défectif comportant un gène suicide pour la préparation d'une
30 composition pharmaceutique destinée au traitement de la resténose.

Comme indiqué ci-avant, on entend au sens de la présente invention par gène suicide tout gène dont le produit d'expression confère à la cellule infectée une sensibilité à un agent thérapeutique. A titre d'exemple, on peut citer le gène de la
35 thymidine kinase, dont le produit d'expression confère aux cellules mammifères une

sensibilité à certains agents thérapeutiques tels le ganciclovir ou l'acyclovir, ou le gène de la cytosine désaminase, dont le produit d'expression confère aux cellules mammifères une sensibilité à la 5-fluoro-cytosine (5-FC).

La thymidine kinase du virus de l'herpès simplex est capable de phosphoryler
 5 les analogues de nucléosides tels que l'acyclovir et le ganciclovir. Ces molécules
 modifiées peuvent être incorporées dans une chaîne d'ADN en cours d'élongation, ce
 qui a pour conséquence l'arrêt de la synthèse d'ADN, entraînant la mort de la cellule
 (F.L. Moolten, Cancer Res. 46 (1986) 5276). Cette stratégie permet ainsi d'éliminer
 spécifiquement les cellules exprimant le gène TK. De plus, la synthèse d'ADN étant la
 10 cible de la toxicité, seules les cellules en cours de division sont affectées.

Plus préférentiellement, on utilise dans le cadre de la présente invention le
 gène de la thymidine kinase du virus de l'herpès humain (hTK HSV-1). La séquence de
 ce gène a été décrite dans la littérature (voir notamment McKnight et al., Nucleic
 Acid. Res. 8 (1980) 5931). Il est également possible d'utiliser des dérivés de cette
 15 séquence présentant une plus grande spécificité de substrat ou une meilleure activité
 kinase. De tels dérivés peuvent en particulier être obtenus par mutagenèse au niveau
 du site de liaison comme décrit précédemment (Balasubramaniam et al., J. Gen. Virol.
 71 (1990) 2979; Munir et al., JBC 267 (1992) 6584).

Il est également possible d'utiliser le gène de la cytosine désaminase, dont le
 20 produit d'expression confère aux cellules mammifères une sensibilité à la 5-fluoro-
 cytosine (5-FC). La cytosine désaminase est capable de catalyser la désamination de la
 cytosine en uracile. Les cellules qui expriment ce gène sont donc capables de convertir
 la 5-fluoro-cytosine (5-FC) en 5-fluoro-uracile (5-FU), qui est un métabolite toxique.
 25 La séquence de ce gène a été décrite dans la littérature (Anderson et al. Arch.
 Microbiol. 152 (1989) 115).

Plus généralement, tout gène capable de conférer aux cellules infectées une
 sensibilité à un agent thérapeutique peut être utilisé dans le cadre de la présente
 30 invention. Le gène de la thymidine kinase constitue un mode de réalisation
 particulièrement avantageux.

Pour la construction des adénovirus selon l'invention, différents sérotypes
 peuvent être utilisés. Il existe en effet de nombreux sérotypes d'adénovirus, dont la
 structure et les propriétés varient quelque peu. Parmi ces sérotypes, on préfère
 35 cependant utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus humains de

type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5) ou les adénovirus d'origine animale (voir demande FR 93 05954). Parmi les adénovirus d'origine animale utilisables dans le cadre de la présente invention on peut citer les adénovirus d'origine canine, bovine, murine, (exemple : Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple : SAV). De préférence, l'adénovirus d'origine animale est un adénovirus canin, plus préférentiellement un adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. De préférence, on utilise dans le cadre de l'invention des adénovirus d'origine humaine ou canine ou mixte.

Comme indiqué ci-avant, les adénovirus selon l'invention sont défectifs, c'est-à-dire qu'ils sont incapables de se répliquer de façon autonome dans la cellule cible. Généralement, le génome des adénovirus défectifs utilisés dans le cadre de la présente invention est donc dépourvu au moins des séquences nécessaires à la réplication dudit virus dans la cellule infectée. Ces régions peuvent être soit éliminées (en tout ou en partie), soit rendues non-fonctionnelles, soit substituées par d'autres séquences et notamment par le gène suicide. Préférentiellement, l'adénovirus défectif conserve néanmoins les séquences de son génome qui sont nécessaires à l'encapsidation des particules virales.

Préférentiellement, les adénovirus défectifs de l'invention comprennent les ITR, une séquence permettant l'encapsidation et le gène suicide. Encore plus préférentiellement, dans le génome des adénovirus de l'invention, le gène E1 et au moins l'un des gènes E2, E4, L1-L5 sont non fonctionnels. Le gène viral considéré peut être rendu non fonctionnel par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par suppression totale, substitution, délétion partielle, ou addition d'une ou plusieurs bases dans le ou les gènes considérés. De telles modifications peuvent être obtenues in vitro (sur de l'ADN isolé) ou in situ, par exemple, au moyens des techniques du génie génétique, ou encore par traitement au moyen d'agents mutagènes.

Les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par toute technique connue de l'homme du métier (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195, EP 185 573; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). En particulier, ils peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un adénovirus et un plasmide portant entre autre le gène suicide. La recombinaison homologue se produit après co-transfection desdits adénovirus et plasmide dans une lignée cellulaire appropriée. La lignée cellulaire utilisée doit de préférence (i) être transformable par lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences capables de compléter la partie du génome de l'adénovirus défectif, de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de

recombinaison. A titre d'exemple de lignée, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59) qui contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome d'un adénovirus Ad5 (12 %). Des stratégies de construction de vecteurs dérivés des adénovirus ont également été décrites dans les demandes n° FR 93 05954 et FR 93 08596.

Ensuite, les adénovirus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire, comme illustré dans les exemples.

Avantageusement, dans les adénovirus de l'invention, le gène suicide est placé sous le contrôle d'un promoteur permettant son expression dans les cellules infectées. Il peut s'agir du propre promoteur du gène suicide, d'un promoteur hétérologue ou d'un promoteur synthétique. Notamment, il peut s'agir de promoteurs issus de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus, y compris du virus utilisé. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs E1A, MLP, CMV, LTR-RSV, etc. En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, ou permettant une expression tissu-spécifique. Il peut en effet être particulièrement intéressant d'utiliser des signaux d'expression actifs spécifiquement ou majoritairement dans les cellules musculaires lisses vasculaires, de manière à ce que le gène suicide ne soit exprimé et ne produise son effet que lorsque le virus a effectivement infecté une cellule musculaire lisse vasculaire.

Dans un mode particulier de réalisation de l'invention, on utilise un adénovirus recombinant déficient comprenant un gène suicide sous le contrôle d'un promoteur viral, choisi de préférence parmi le LTR-RSV ou le promoteur précoce du CMV.

La présente invention fournit ainsi une méthode particulièrement efficace pour le traitement de la resténose. Par ailleurs, pour augmenter encore l'efficacité et la spécificité du traitement, la demanderesse a mis au point une méthode permettant une administration locale des adénovirus recombinants au niveau des sites à traiter. Plus particulièrement, cette méthode repose sur l'utilisation d'un ballon d'angioplastie enrobé d'un film hydrophile (par exemple un hydrogel) imbibé d'adénovirus, qui peut ainsi être appliqué de manière précise sur le site à traiter, et permettre une libération locale et efficace des adénovirus au niveau des cellules à traiter. En outre, la

demanderesse a montré que cette méthode d'administration permettait d'infecter un pourcentage élevé de cellules de la média (jusqu'à 9,6%), qui constituent la cible préférentielle pour le traitement de la resténose, alors que les méthodes d'administration classiques (injection intraveineuse par exemple) ne permettent pas d'infecter de manière très significative ces cellules.

Un objet de la présente invention concerne donc une composition pharmaceutique comprenant un adénovirus recombinant défectif et un hydrogel. Plus spécifiquement, l'invention concerne une composition comprenant un adénovirus recombinant défectif comportant un gène suicide, et un hydrogel. L'hydrogel utilisé dans le cadre de la présente invention peut être préparé à partir de tout polymère (homo ou hétéro) bio-compatible et non cytotoxique. De tels polymères ont par exemple été décrits dans la demande WO93/08845. Certains d'entre eux, comme notamment ceux obtenus à partir d'oxyde d'éthylène et/ou de propylène sont commerciaux.

La méthode de traitement de l'invention consiste donc avantageusement à introduire, au niveau du site à traiter, une composition comprenant un hydrogel imbibé d'adénovirus recombinants. L'hydrogel peut être déposé directement sur la surface du tissu à traiter, par exemple au cours d'une intervention chirurgicale. Avantageusement, l'hydrogel être introduit au niveau du site à traiter au moyen d'un cathéter, par exemple d'un cathéter à ballonnet, notamment lors de l'angioplastie. De manière particulièrement avantageuse, l'hydrogel imbibé est introduit au niveau du site à traiter au moyen d'un cathéter à ballonnet, comme décrit dans les exemples. Les résultats présentés dans les exemples démontrent en effet l'efficacité de ce système pour le transfert percutané de gènes dans les parois artérielles.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Légende des figures

- Figure 1 : Représentation du vecteur pONT-tk
Figure 2 : Représentation du vecteur pRSV-tk

Techniques générales de biologie moléculaire

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc ... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories).

Pour les ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'*E. coli* (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagénèse dirigée in vitro par oligodéoxynucléotides synthétiques peut être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

Exemples

Exemple 1. Construction du vecteur Ad-LTR-TK portant le gène TK sous le contrôle du promoteur du LTR du virus du sarcome de rous (LTR-RSV) (figure 1).

Cet exemple décrit la construction d'un adénovirus recombinant comprenant le gène de la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex (tk) sous le contrôle d'un promoteur viral (promoteur LTR-RSV). Cet adénovirus a été construit par recombinaison homologue entre l'adénovirus défectif Ad-dl1324 et le plasmide pRSVtk portant le gène tk sous contrôle du promoteur RSV (exemple 1.3.). Ce plasmide a été construit à partir du plasmide pONTtk (exemple 1.1.), par substitution du promoteur transactivable par EBNA1 par le promoteur RSV (exemple 1.2.).

1.1. Construction du plasmide pONTtk

a) Construction du plasmide p7tk1

Cet exemple décrit la construction du plasmide p7tk1 contenant la phase ouverte de lecture du gène tk de 1131 paires de bases (ATG 114-116 et codon stop TGA 1242-1244), insérée dans un multisite de clonage.

Le fragment BglII-NcoI contenant le gène de la thymidine kinase (tk) du virus herpès simplex type 1 a été isolé à partir du plasmide pHSV-106 (commercialisé par Gibco BRL), réparé par l'action du fragment klenow puis inséré au site SmaI du plasmide pGEM7zf(+) (commercialisé par Promega). Les sites SmaI et BgIII sont détruits lors de cette étape, le site NcoI est conservé.

Le plasmide obtenu a été désigné p7tk1.

b) Construction du plasmide pONT1

Cet exemple décrit la construction d'un plasmide contenant un promoteur chimère constitué d'une séquence nécessaire à la transactivation par l'antigène EBNA1 et du promoteur TP1 du virus EBV.

Le fragment EcoRI(7315)-SmaI(8191) du virus EBV a été isolé à partir de la souche B95-8. La séquence complète du virus EBV a été décrite par Baer et al. (Nature 310 (1984) 207). Ce fragment contient les séquences nécessaires à la transactivation par l'antigène nucléaire 1 (EBNA1) (D. Reisman & B. Sugden, 1986, Molecular and Cellular Biology, vol. 6 pp. 3838-3846). Ce fragment a ensuite été fusionné au fragment NruI(166 241)-PstI(166 559) de l'EBV B95-8 (le site PstI a été digéré par la polymérase T4), contenant le promoteur TP1. Le promoteur chimère

ainsi obtenu a ensuite été inséré dans le multisite de clonage du plasmide pBluescript II SK pour générer le plasmide pONT1.

c). Construction du plasmide pONTtk

Le plasmide pONTtk comporte le gène de la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex (tk) cloné dans le plasmide p7tk1, sous le contrôle du promoteur chimère EBNA1-RE/TP1 cloné dans le plasmide pONT1.

Pour construire ce plasmide, le fragment BamHI-XhoI de pONT1 qui contient le promoteur chimère transactivé par EBNA-1 et EBNA-2, et le fragment XhoI-ClaI de p7tk1 qui contient la phase ouverte de lecture de tk ont été clonés aux sites BamHI (478) et ClaI (4550) du plasmide pAd.RSVbgal. Le plasmide pAd.RSVbGal contient, dans l'orientation 5'→3',

- le fragment PvuII correspondant à l'extrémité gauche de l'adénovirus Ad5 comprenant : la séquence ITR, l'origine de réplication, les signaux d'encapsidation et l'amplificateur E1A;
- le gène codant pour la b-galactosidase sous le contrôle du promoteur RSV (du virus du sarcome de Rous),
- un second fragment du génome de l'adénovirus Ad5, qui permet la recombinaison homologue entre le plasmide pAd.RSVbGal et l'adénovirus d1324. Le plasmide pAd.RSVbGal a été décrit par Stratford-Perricaudet et al. (J. Clin. Invest. 90 (1992) 626).

Tous les sites de clonage sont conservés. Le plasmide obtenu a été désigné pONTtk.

1.2. Construction du plasmide pRSVtk

Ce plasmide a été construit à partir du plasmide pONTtk (exemple 1.1.), par substitution du promoteur transactivable par EBNA1 par le promoteur RSV. Pour cela, le promoteur RSV a été isolé sous forme d'un fragment BamHI-SalI à partir du plasmide pAd.RSV.βgal (Stratford-Perricaudet et al., J. Clin. Invest. 90 (1992) 626), puis cloné aux sites BamHI(478) et SalI(1700) du plasmide pONTtk. Le plasmide résultant a été désigné pRSVtk (figure 1).

1.3. Construction de l'adénovirus recombinant Ad-RSV-tk

Le vecteur pRSVtk a été linéarisé et cotransfecté avec un vecteur adénoviral déficient, dans les cellules helper (lignée 293) apportant en *trans* les fonctions codées par les régions E1 (E1A et E1B) d'adénovirus.

Plus précisément, l'adénovirus Ad-RSV-tk a été obtenu par recombinaison homologue *in vivo* entre l'adénovirus mutant Ad-dl1324 (Thimmappaya et al., Cell 31 (1982) 543) et le vecteur pRSVtk, selon le protocole suivant : le plasmide pRSVtk, linéarisé par XmnI, et l'adénovirus Ad-dl1324, linéarisé par l'enzyme ClaI, ont été co-transfectés dans la lignée 293 en présence de phosphate de calcium, pour permettre la recombinaison homologue. Les adénovirus recombinants ainsi générés ont été sélectionnés par purification sur plaque. Après isolement, l'ADN de l'adénovirus recombinant a été amplifié dans la lignée cellulaire 293, ce qui conduit à un surnageant de culture contenant l'adénovirus défectif recombinant non purifié ayant un titre d'environ 10^{10} pfu/ml.

Les particules virales sont ensuite purifiées par centrifugation sur gradient de chlorure de césium selon les techniques connues (voir notamment Graham et al., Virology 52 (1973) 456). L'adénovirus Ad-RSV-tk peut être conservé à -80°C dans 20 % de glycérol.

Exemple 2 : Activité d'un adénovirus selon l'invention en présence de ganciclovir sur les cellules musculaires lisses en culture.

L'activité de l'adénovirus contenant le gène TK préparé dans l'exemple 1 a été contrôlée sur des modèles *in vitro* de cellules musculaires lisses. Pour cela, les cellules musculaires lisses isolées à partir d'aorte de rat et de lapin ont été infectées par l'adénovirus recombinant Ad-RSV-tk, et incubées en présence de ganciclovir. L'effet de la combinaison Ad-RSV-tk / ganciclovir sur la viabilité cellulaire est ensuite confirmé par test colorimétrique MTT, 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide, selon la technique décrite par Mosman (J.Immunol.Meth. 65 (1983) 55).

Exemple 3 : Transfert artériel d'un adénovirus recombinant par voie percutanée

Cet exemple décrit la mise au point d'une technique particulièrement efficace pour le transfert de gènes par voie percutanée. Cette technique repose sur l'utilisation d'un cathéter à ballonnet à hydrogel. Les résultats présentés montrent que, de manière tout à fait avantageuse, cette technique permet d'infecter efficacement certaines populations cellulaires privilégiées, notamment pour le traitement de la resténose.

Cet exemple a été réalisé au moyen d'un adénovirus recombinant défectif comprenant le gène de la β -galactosidase d'E.coli sous le contrôle du promoteur du LTR-RSV et d'un signal de localisation nucléaire. La construction de cet adénovirus a été décrite notamment dans Stratford-Perricaudet et al., (J. Clin. Invest. 90 (1992) 626).

Les expériences ont été réalisées sur des lapins blancs de Nouvelle Zélande anesthésiés à l'acépromazine et maintenus sous pentobarbital. Le transfert de gène a été effectué au niveau de l'artère iliaque externe.

L'adénovirus Ad-RSV. β -Gal ($1-2.10^{10}$ pfu dans 100 μ l de tampon phosphate) a été déposé sur un cathéter à ballonnet préalablement enduit d'hydrogel (Hydroplus, Mansfield Medical, Boston Scientific Corp., Watertown, MA) (Riessen et al., Hum.Gene Ther. 4 (1993) 749). Le cathéter utilisé est un cathéter à ballonnet de 2 cm de longueur, et de diamètre compris entre 2,5 et 3 mm. Le cathéter a ensuite été introduit, en utilisant un manchon protecteur, dans l'artère fémorale droite. Une pression de une atmosphère a ensuite été appliquée, puis le cathéter a été dirigé jusqu'à l'artère iliaque externe où une pression de 6 atmosphère a alors été appliquée au ballonnet pendant 30 minutes. Cette expérience a été réalisée sur 27 lapins. 3 à 28 jours après l'administration, les animaux ont été sacrifiés par overdose de pentobarbital.

Transfert et expression du gène dans la paroi artérielle

Les artères des animaux sacrifiés ont été isolées, et l'expression de la β -galactosidase a été détectée par coloration en présence de X-gal selon la technique de Sanes et al (EMBO J. 5 (1986) 3133). Pour chaque animal, deux segments artériels au moins ont été soit montés sur OCT (Laboratoires Miles Inc.; IL) pour des expériences de cryosection, ou enduit de paraffine, coupés en sections de 6 μ m et contrecolorés à l'hématoxyline et l'éosine. L'expression a été considérée comme positive seulement lorsqu'une coloration bleu foncé était observée dans le noyau. Les résultats obtenus montrent clairement que les artères des animaux infectés présentent une coloration bleu caractéristique de la β gal. Une analyse microscopique révèle qu'il n'y a pas d'endothélium intact résiduel, mais que la continuité de la lamina élastique interne est préservée. L'analyse microscopique montre également que les cellules de la média ont été infectées par les adénovirus et expriment le gène transféré. Plus précisément, alors que dans le cas d'une administration par cathéter à double ballonnets, 0,4% seulement

des cellules de la média ont été infectées, 9,6% le sont en utilisant un cathéter à ballonnet enduit d'hydrogel (voir analyse morphométrique ci-après). De plus, les 9,6 % sont calculés par rapport à l'épaisseur totale de la média mais dans les couches superficielles de la média, 100% des cellules sont infectées. Ces résultats sont bien supérieurs à ceux obtenus avec les cathéters à double ballonnets, ou par transfert de gène nu ou au moyen de liposomes. Ces expériences démontrent combien les adénovirus peuvent constituer un vecteur particulièrement avantageux pour l'administration de gènes suicides en vue du traitement de la resténose.

10 Analyse morphométrique

L'efficacité de transfert a été déterminée sur 7 lapins traités. Tous ces animaux ont reçu 5.10^9 pfu d'adénovirus pour infecter un segment artériel de 2 cm de longueur, de telle sorte que la multiplicité d'infection est similaire pour chaque animal. Pour chaque artère iliaque transfectée, deux segments sériés de 5 mm de longueur ont été prélevés de la zone cible et, pour chaque segment, au moins trois sections au hasard ont été examinées au microscope optique après coloration au X-gal. Sur chaque section, l'efficacité de transfert a été déterminée par le rapport des cellules de la média colorées sur le nombre total des cellules de la média. Au total, plus de 30.10^3 cellules provenant des artères infectées par les adénovirus (48 sections) ont été comptées. Le pourcentage moyen de cellules de la média infectées est de 4.02%, avec des valeurs pouvant atteindre 9,6%. Dans le cas d'un transfert par cathéter à double ballonnet, le pourcentage moyen est seulement de 0,18%.

25 Cinétique d'expression

Pour déterminer la durée de l'expression du gène transféré par les adénovirus selon l'invention, une étude de l'expression de la β -gal a été réalisée au cours du temps sur 20 lapins traités soit par cathéter à double ballonnet (10 animaux), soit par cathéter à ballonnet imbibé d'hydrogel (10 animaux). Pour chaque groupe, 2 animaux ont été sacrifiés au jour 3, 7, 14, 21 et 28. L'expression a été détectée par examens macroscopique et microscopique d'artères colorées au X-gal comme décrit plus haut. Les résultats obtenus montrent, pour chaque groupe, une expression stable pendant 14 jours, suivie d'une baisse à 21 jours. Aucune expression n'est détectée à 28 jours. Ces

résultats confirment l'effet transitoire des vecteurs de l'invention, particulièrement avantageux et adapté au traitement de la resténose.

Sélectivité du transfert et de l'expression au niveau des parois artérielles

5

Afin de contrôler la dissémination possibles à d'autres tissus des adénovirus injectés, dans tous les animaux sacrifiés 3 jours après l'injection, des échantillons de tissu provenant du foie, cerveau, testicules, coeur, poumon, rein, et muscle squelettique, ainsi qu'un segment artériel adjacent au site traité ont été prélevés
10 immédiatement après le sacrifice. Sur chaque échantillon, le transfert et l'expression du gène ont été mis en évidence par PCR (au moyen de sondes dirigées contre le gène codant pour la protéine IX de l'adénovirus et contre le gène lacZ) et histochimie. Les résultats obtenus montrent que aucun des échantillons prélevés à partir des animaux traités par cathéter à ballonnets enduits d'hydrogel, ne présente de coloration dans les
15 tissus testés. De la même manière, aucune présence de virus n'a pu être détectée par PCR dans les échantillons testés, même en utilisant un protocole optimisé et très sensible de 45 cycles d'amplifications.

Ces résultats démontrent l'efficacité du mode d'administration selon l'invention pour délivrer de manière très locale les gènes thérapeutiques.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'un adénovirus recombinant défectif comportant un gène suicide pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement de la resténose.
2. Utilisation selon la revendication 1 caractérisée en ce que le gène suicide est choisi parmi le gène de la thymidine kinase et le gène de la cytosine désaminase.
3. Utilisation selon la revendication 1 caractérisée en ce que le gène suicide est le gène de la thymidine kinase du virus de l'herpès humain (HSV-1 TK).
4. Utilisation selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que le gène suicide est placé sous le contrôle d'un promoteur permettant son expression dans les cellules infectées.
5. Utilisation selon la revendication 4 caractérisée en ce que le promoteur est choisi parmi les promoteurs viraux, de préférence le promoteur LTR-RSV et CMV.
6. Utilisation selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que l'adénovirus comprend les ITR, une séquence permettant l'encapsidation et le gène suicide.
7. Utilisation selon la revendication 6 caractérisée en ce que l'adénovirus comprend les ITR, une séquence permettant l'encapsidation, le gène suicide, et dans lequel le gène E1 et au moins l'un des gènes E2, E4, L1-L5 est non fonctionnel.
8. Utilisation selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que l'adénovirus est un adénovirus d'origine humaine, choisi de préférence parmi les sérotypes Ad2 et Ad5.
9. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisée en ce que l'adénovirus est un adénovirus d'origine animale, choisi de préférence parmi les adénovirus canins.

10. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 9 caractérisée en ce que l'adénovirus est imbibé dans un hydrogel.

5 11. Utilisation selon la revendication 10 caractérisée en ce que l'hydrogel est déposé sur un cathéter à ballonnet.

12. Composition pharmaceutique comprenant un adénovirus recombinant défectif imbibé dans un hydrogel.

10 13. Composition pharmaceutique selon la revendication 12 caractérisée en ce que l'adénovirus recombinant défectif comporte un gène suicide.

15 14. Dispositif pour l'administration de gènes par voie percutanée caractérisé en ce qu'il comprend un cathéter à ballonnet enduit d'un hydrogel, l'hydrogel étant imbibé d'un adénovirus recombinant défectif comportant ledit gène.

REVENDICATIONS

1. Composition pharmaceutique comprenant un adénovirus recombinant défectif imbibé dans un hydrogel.

5

2. Composition pharmaceutique selon la revendication 1 caractérisée en ce que l'adénovirus recombinant défectif comporte un gène suicide.

10

3. Dispositif pour l'administration de gènes par voie percutanée caractérisé en ce qu'il comprend un cathéter à ballonnet enduit d'un hydrogel, l'hydrogel étant imbibé d'un adénovirus recombinant défectif comportant ledit gène.

REVENDICATIONS

1. Composition pharmaceutique comprenant un adénovirus recombinant défectif comportant un gène suicide, imbibé dans un hydrogel.

5

2. Dispositif pour l'administration de gènes par voie percutanée caractérisé en ce qu'il comprend un cathéter à ballonnet enduit d'un hydrogel, l'hydrogel étant imbibé d'un adénovirus recombinant défectif comportant un gène suicide.

1/2

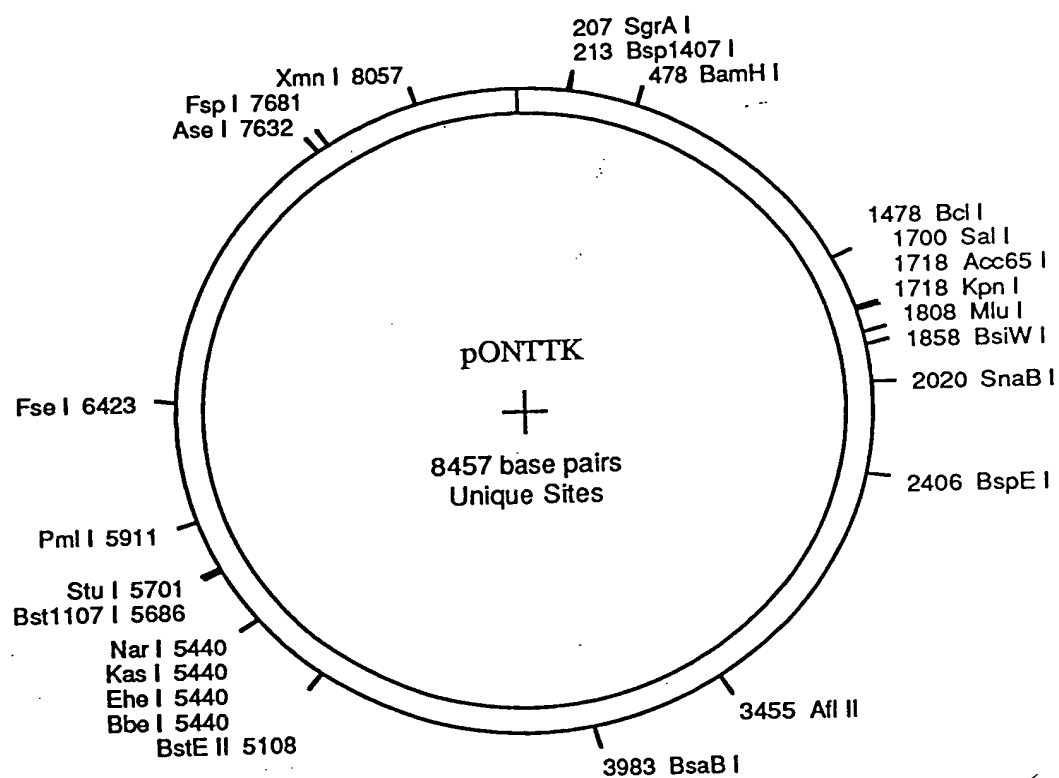


Figure 1

2/2

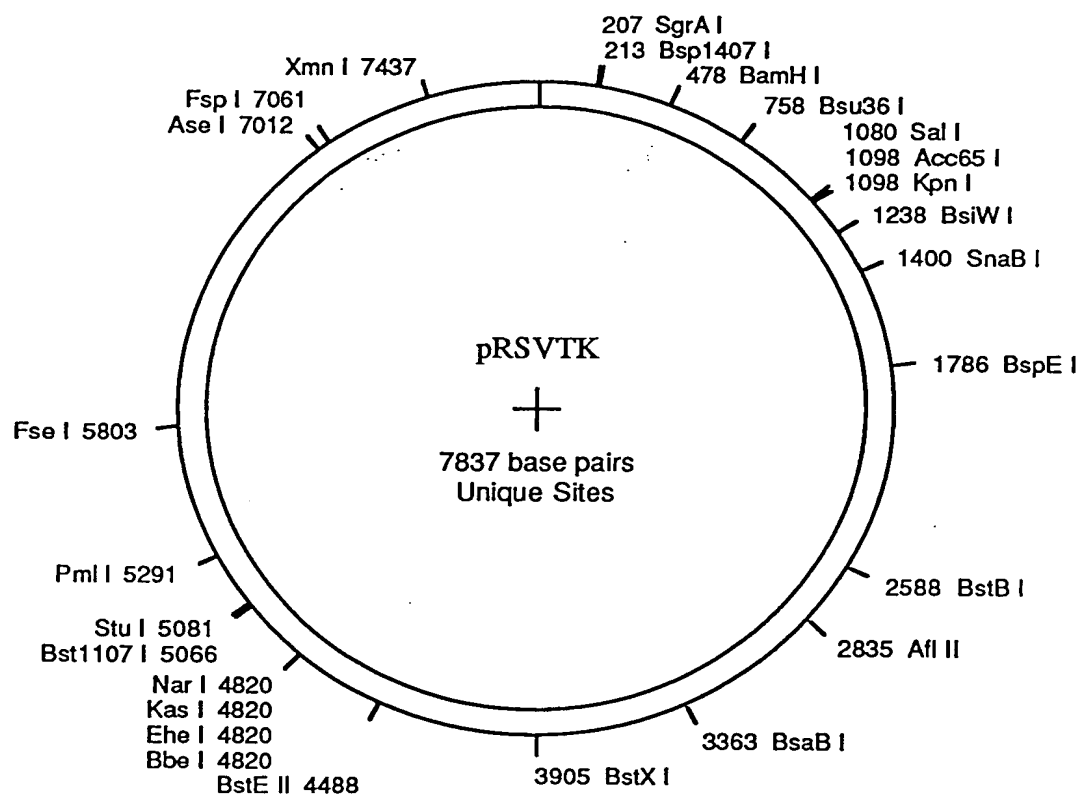


Figure 2



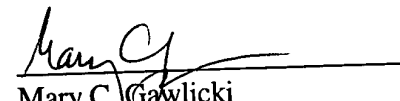
18A Ledgebrook Drive • Mansfield Center, CT 06250 USA
Tel: 860.450.0405 • Fax: 860.450.0409
Email: sales@corptransinc.com • Web: www.corptransinc.com



CERTIFICATION

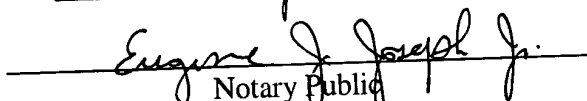
This is to certify that Corporate Translations, Inc. has performed a true translation for *Finnegan, Henderson, Farabow, Garrett & Dunner LLP* of the attached *French Patent – Method Of Treating Restenosis By Gene Therapy – National Registration No. 94 10083*. This document was prepared by a translator who is fully bilingual in both French and English.

Authorized Signature:


Mary C. Gawlicki
President
Corporate Translations, Inc.

September 17, 2003

“Subscribed and sworn to before me
this 17th day of September, 20 03”


Notary Public
Date Commission Expires: 1-31-07



PATENT OF INVENTION

CERTIFICATE OF UTILITY – CERTIFICATE OF ADDITION

OFFICIAL COPY

The Director of the National Institute of Industrial Property certifies that the attached document is a certified true copy of an application for a certificate of industrial property filed at the Institute.

Done in Paris,

September 3, 2003

For the Director of the National
Institute of Industrial Property
The Head of the Patent Department

[signature]

Martine PLANCHE

NATIONAL
INSTITUTE OF
INDUSTRIAL
PROPERTY

MAIN OFFICE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Telephone: 33 (0)1 53 04 53 04
Fax: 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

PETITION TO ISSUE A CERTIFICATE OF INDUSTRIAL PROPERTY*		1 <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 5%; text-align: center;">a</td> <td style="width: 5%; text-align: center;"><input checked="" type="checkbox"/></td> <td style="width: 90%;">PATENT OF INVENTION</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">b</td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> <td>(illegible) CERTIFICATE</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">c</td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> <td>DIVISIONAL APPLICATION</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">d</td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> <td>TRANSFORMATION OF A EUROPEAN PATENT APPLICATION</td> </tr> </table>		a	<input checked="" type="checkbox"/>	PATENT OF INVENTION	b	<input type="checkbox"/>	(illegible) CERTIFICATE	c	<input type="checkbox"/>	DIVISIONAL APPLICATION	d	<input type="checkbox"/>	TRANSFORMATION OF A EUROPEAN PATENT APPLICATION	2 ONE OPTION MUST BE SELECTED at the time of filing (except for the utility certificate) <table style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%;"> IS THE APPLICANT APPLYING FOR DEFERRED ISSUANCE (illegible)? </td> <td style="width: 10%; text-align: center;"> <input type="checkbox"/> YES <input checked="" type="checkbox"/> NO </td> <td style="width: 40%;"> IF THE OPTION SELECTED IS NO AND IF THE APPLICANT IS AN INDIVIDUAL, (illegible) PAYMENT OF THE SEARCH FEE IN INSTALLMENTS? </td> <td style="width: 10%; text-align: center;"> <input type="checkbox"/> YES <input checked="" type="checkbox"/> NO </td> </tr> </table>		IS THE APPLICANT APPLYING FOR DEFERRED ISSUANCE (illegible)?	<input type="checkbox"/> YES <input checked="" type="checkbox"/> NO	IF THE OPTION SELECTED IS NO AND IF THE APPLICANT IS AN INDIVIDUAL, (illegible) PAYMENT OF THE SEARCH FEE IN INSTALLMENTS?	<input type="checkbox"/> YES <input checked="" type="checkbox"/> NO
a	<input checked="" type="checkbox"/>	PATENT OF INVENTION																			
b	<input type="checkbox"/>	(illegible) CERTIFICATE																			
c	<input type="checkbox"/>	DIVISIONAL APPLICATION																			
d	<input type="checkbox"/>	TRANSFORMATION OF A EUROPEAN PATENT APPLICATION																			
IS THE APPLICANT APPLYING FOR DEFERRED ISSUANCE (illegible)?	<input type="checkbox"/> YES <input checked="" type="checkbox"/> NO	IF THE OPTION SELECTED IS NO AND IF THE APPLICANT IS AN INDIVIDUAL, (illegible) PAYMENT OF THE SEARCH FEE IN INSTALLMENTS?	<input type="checkbox"/> YES <input checked="" type="checkbox"/> NO																		
DATE DOCUMENTS SUBMITTED <div style="text-align: center; font-weight: bold;">AUGUST 17, 1994</div>		SIGNATURE _____ NUMBER _____ DATE OF INITIAL APPLICATION _____																			
NATIONAL REGISTRATION No. <div style="text-align: center; font-weight: bold;">94 10083-</div>		3 Name and address of applicant (illegible) <div style="text-align: center;"> RHONE-POULENC RORER S.A. Direction Brevets 20, av Raymond Aron 92165 Antony Cedex </div>																			
POSTAL CODE OF FILING LOCATION		4 PERMANENT PROXY NUMBER <div style="text-align: center;">January 15, 1991</div>																			
5 CORRESPONDENT REFERENCE No. <div style="text-align: center;">ST 94067</div>		6 CORRESPONDENT TELEPHONE No. <div style="text-align: center;">40 91 70 36</div>																			

7 TITLE OF THE INVENTION

METHOD OF TREATING RESTENOSIS BY GENE THERAPY

8 APPLICANT(S) - Full name - underline last name and company name or legal name

(illegible) No.

RHONE-POULENC RORER S.A.
 CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
 INSTITUT GUSTAVE ROUSSY

9 COMPLETE ADDRESS(ES)

20, av Raymond Aron, 92160 Antony
 3, rue Michel Ange, 75016 Paris
 39, rue Camille Desmoulins, 94800 Villejuif

COUNTRY

FRANCE

10 NATIONALITY(IES)

French

FEES PAID
☒ FILING

☒ RESEARCH REPORT

☐ PRIORITY CLAIM

☒ CLAIM (starting with the 1st (illegible))

11 INVENTOR(S)

THE APPLICANT IS THE SOLE
 INVENTOR*
 If the answer is no, see explanatory note.

☐ YES

☒ NO

12

IF THE APPLICANT IS A NON-
 ASSESSABLE INDIVIDUAL, HE IS
 APPLYING FOR* OR HAS APPLIED
 FOR REDUCED FEES*

☐ YES

☒ NO

**13 DECLARATION OF PRIORITY
 OR APPLICATION FOR BENEFIT
 OF FILING DATE OF A PRIOR
 APPLICATION**

COUNTRY OF ORIGIN

FILING DATE

NUMBER

14
☐ DIVISIONS (illegible)

15 SIGNATURE OF APPLICANT OR REPRESENTATIVE (illeg.)

RHONE-POULENC RORER S.A.
 Authorized Representative

[signature]
 PHILIPPE Becker

SIGNATURE OF OFFICER AT RECEPTION DESK

SIGNATURE AFTER REGISTRATION OF THE APPLICATION AT THE INPI

[signature]

*Check the appropriate box

Patent Administrative Division

NAME OF THE INVENTOR

ST 94067

(if the applicant is not the inventor or the sole inventor)

National Registration No.

94 10083

Title of the Invention:

METHOD OF TREATING RESTENOSIS BY GENE THERAPY

The undersigned

RHONE-POULENC RORER S.A., 20, av Raymond Aron, 92160 Antony, FRANCE
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE, 3, rue Michel Ange, 75016 Paris, France
INSTITUT GUSTAVE ROUSSY, 39, Camille Desmoulins, 94800 Villejuif, FRANCE

Designate as the inventor(s) (indicate full name and address and underline the last name):

BRANELLEC Didier, 1, rue Saint-Benoit, 94210 La Varenne – Saint-Hilaire, FRANCE

DEDIEU, Jean-Francois, 84, quai de Jemmapes, 75010 Paris, FRANCE

DENEFLÉ Patrice, 45, av des Fusillés de Chateaubriand, 94100 Saint-Maur, FRANCE

FELDMAN Laurent, 8, rue de la Neva, 75017 Paris, FRANCE

PERRICAUDET Michel, 31, rue de Chartres, 28320 Ecrosnes, FRANCE

STEG Gabriel, 93, rue Jouffroy, 75017 Paris, FRANCE

NOTE: In exceptional cases, the name of the inventor may be followed by the name of his company (the company to which he belongs) when it is different from the applicant company or the patentee.

Date and signature(s) of the applicant(s) or representative

Antony, August 17, 1994

RHONE-POULENC S.A.
Authorized Representative

[signature]

Philippe BECKER

DOCUMENT COMPRISING MODIFICATIONS

PAGE(S) OF THE DESCRIPTION OR CLAIMS OR DRAWING BOARD(S)			MC*	DATE OF CORRESPONDENCE	CORRECTOR'S DATE STAMP
Modified	Deleted	Added			
14	15		X	01/11/95	JANUARY 18 1995 CJ
14			X	07/24/95	APRIL 11 1996 OL

Unless it is derived from the provisions of Article 28 of the decree of September 19, 1979, a change in the wording of the original claims is indicated by the abbreviation "MC" (modified claims).

BT 244/171180

METHOD FOR THE TREATMENT OF RESTENOSIS BY
GENE THERAPY

5 The present invention pertains to a method for the treatment of restenosis by gene therapy, comprising the administration of a recombinant adenovirus comprising a suicide gene. It also pertains to particular pharmaceutical compositions that permit the local and effective administration of recombinant viruses.

10 Atherosclerosis is a complex, polygenic disease which is histologically defined by deposits (lipid or fibro-lipid plaques) of lipids and other blood derivatives in the walls of large arteries (aorta, coronary and carotid arteries). These plaques, which are more or less calcified depending on the advancement of the process, may be combined with lesions and are linked to the accumulation in the arteries of fatty deposits consisting essentially of cholesterol esters. These plaques are accompanied by a thickening of the arterial wall, with smooth muscle hypertrophy, the appearance of foam cells and the accumulation of fibrous tissue. The atheromatous plaque is a very definite bulge in the wall, providing the characteristic stenosis which is responsible for the vascular occlusions due to the atheroma, thrombosis or embolism which occur in the most severely affected patients. Thus, these lesions can lead to extremely serious cardiovascular diseases such as infarction, sudden death, heart failure, cerebrovascular accidents, etc.

20 The technique of angioplasty was developed in 1977 to permit non-surgical intervention for the treatment of atherosclerotic plaque. However, treatment of an atherosclerotic lesion by angioplasty very often results in restenosis (up to 50% of cases in some studies) following the mechanical injury to the arterial wall. A key event of this mechanism is the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells (VSMC) from the media to the intima, notably because of the lack of protection and/or retrocontrol exerted by the endothelial cells of the intima.

30 Treatment of restenosis by the administration of chemical or protein substances capable of killing vascular smooth muscle cells has been proposed in the prior art. Thus, psolaren derivatives, incorporated by proliferative cells, and thus sensitizing these cells to the action of light have been used (March et al, 1993, circulation, 87:184-191). In the same manner, certain cytotoxins consisting of a fusion protein between a plant or bacterial toxin fragment and a growth factor

have also been used (Pickering et al, J. Clin. Invest., 1993, 91:724-729; Biro et al, 1992, Circ. Res., 71:640-645; Casscells et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89:7159-7163). However, these treatments present numerous disadvantages, such as their poor specificity, their moderate efficacy, a long delay of onset of action and potential toxicity.

5 The present invention provides an advantageous solution to this problem. The present invention actually provides a particularly effective and selective method for the treatment of post-angioplasty restenosis by gene therapy. The method of the present invention consists principally of administering a recombinant adenovirus comprising a suicide gene, capable of specifically sensitizing proliferating vascular smooth muscle cells to a therapeutic agent. The simultaneous or
10 subsequent administration of this therapeutic agent then leads to the selective death of the sensitized cells.

 The advantages of the present invention lie notably in the strong capacity of the adenoviruses of the invention to infect proliferating vascular smooth muscle cells. This permits the use of relatively small quantities of active ingredient (recombinant adenovirus), and it also permits
15 extremely rapid and effective action on the sites to be treated. The adenoviruses of the invention are also capable of expressing very high levels of the suicide genes introduced, which provides them with extremely effective therapeutic action. Moreover, because of their episomal nature, the adenoviruses of the invention have limited persistence in proliferative cells, and therefore, a transient effect that is perfectly suited to the desired therapeutic effect. Finally, the applicant has
20 also developed a particularly advantageous method of administration which permits highly effective infection of certain target cells that are essential for the desired therapeutic effect.

 A primary object of the invention, therefore, pertains to the use of a defective recombinant adenovirus comprising a suicide gene for the preparation of a pharmaceutical composition
25 intended for the treatment of restenosis.

 As indicated above, in the sense of the present invention, suicide gene means any gene whose expression product provides the infected cell with sensitivity to a therapeutic agent. By way of example, we can cite the thymidine kinase gene, whose expression product provides mammalian
30

cells with sensitivity to some therapeutic agents, such as ganciclovir or acyclovir, or the cytosine deaminase gene, whose expression product provides mammalian cells with sensitivity to 5-fluorocytosine (5-FC).

The thymidine kinase of the herpes simplex virus is capable of phosphorylating nucleoside analogs, such as acyclovir and ganciclovir. These modified molecules can be incorporated into a DNA chain in the course of elongation, which results in the arrest of DNA synthesis, leading to the death of the cell (F.L. Moolten, *Cancer Res.* 46 (1986) 5276). Thus, this strategy specifically eliminates cells expressing the TK gene. Moreover, since DNA synthesis is the target of the toxicity, only the cells in the process of division are affected.

More preferably, the thymidine kinase gene of the human herpes virus (hTK HSV-1) is used in the context of the present invention. The sequence of this gene has been described in the literature (in particular, see McKnight et al., *Nucleic Acid. Res.*, 8 (1980) 5931). It is also possible to use derivatives of this sequence which have greater substrate specificity or better kinase activity. Such derivatives may, in particular, be obtained by mutagenesis at the binding site as described previously (Balasubramaniam et al., *J. Gen. Virol.* 71 (1990) 2979; Munir et al., *JBC* 267 (1992) 6584).

It is also possible to use the cytosine deaminase gene, whose expression product provides mammalian cells with sensitivity to 5-fluorocytosine (5-FC). Cytosine deaminase is capable of catalyzing the deamination of cytosine to uracil. The cells that express this gene are, therefore, capable of converting 5-fluorocytosine (5-FC) to 5-fluorouracil (5-FU), which is a toxic metabolite. The sequence of this gene has been described in the literature (Anderson et al. *Arch. Microbiol.* 152 (1989) 115).

More generally, any gene capable of providing infected cells with sensitivity to a therapeutic agent can be used in the context of the present invention. The thymidine kinase gene constitutes a particularly advantageous method of embodiment.

For the construction of the adenovirus according to the invention, different serotypes may be used. In fact, there are many adenovirus serotypes, whose structure and properties vary somewhat. Among these serotypes, however, in the context of the present invention it is preferable to use type 2 or 5 human adenoviruses (Ad2 or Ad5) or adenoviruses of animal origin (see application FR 93 05954). Among the adenoviruses of animal origin that can be used in the context of the

present invention we can cite adenoviruses of canine, bovine, murine origin (example: Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovine, porcine, avian or even simian (example: SAV) origin. Preferably, the adenovirus of animal origin is a canine adenovirus, more preferably a CAV2 adenovirus [Manhattan strain or A26/61 (ATCC VR-800) for example]. Preferably, adenoviruses
5 of human or canine or mixed origin are used in the context of the invention.

As indicated above, the adenoviruses according to the invention are defective, in other words, they are incapable of replicating independently in the target cell. Generally, the genome of the defective adenoviruses used in the context of the present invention, therefore, lacks at least the sequences necessary for replication of said viruses in the infected cell. These regions can either be
10 eliminated (completely or partly), or rendered non-functional, or replaced by other sequences, and notably by the suicide gene. Nevertheless, the defective adenovirus preferably retains the sequences of its genome which are necessary for the encapsidation of viral particles.

Preferably, the defective adenoviruses of the invention comprise ITR, a sequence that permits
15 encapsidation and the suicide gene. Even more preferably, in the genome of the adenoviruses of the invention, the E1 gene and at least one of the E2, E4, L1-L5 genes are non-functional. The viral gene in question may be rendered non-functional by any method known to those skilled in the art, and notably by total suppression, substitution, partial deletion, or the addition of one or more bases in the gene or genes in question. Such modifications can be obtained *in vitro* (on
20 isolated DNA) or *in situ*, for example, by means of genetic engineering techniques, or even by treatment with mutagenic agents.

The defective recombinant adenoviruses according to the invention can be prepared by any technique known to those skilled in the art (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195, EP 185 573; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). In particular, they can be prepared by homologous
25 recombination between an adenovirus and a plasmid bearing among other things the suicide gene. Homologous recombination takes place after cotransfection of said adenoviruses and plasmid into an appropriate cell line. The cell line used should preferably (i) be transformable by said elements, and (ii) comprise the sequences capable of complementing the part of the defective adenovirus genome, preferably in integrated form to avoid the risk of recombination. As an example of a line,

the human embryonic kidney line 293 can be cited (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59), which contains notably, integrated into its genome, the left part of the genome of an Ad5 adenovirus (12%). Strategies for constructing vectors derived from adenoviruses have also been described in [patent] application Nos. FR 93 05954 and FR 93 08596.

5 Next, adenoviruses which are multiplied are recovered and purified according to classic molecular biology methods, as illustrated in the examples.

Advantageously, in the adenoviruses of the invention, the suicide gene is placed under the control of a promoter permitting its expression in the infected cells. This may be the promoter of
10 the suicide gene itself, a heterologous promoter or a synthetic promoter. Notably, they may be promoters derived from eukaryotic or viral genes. For example, it may involve promoter sequences derived from the genome of the cell that is to be infected. It may also involve promoter sequences derived from the genome of a virus, including the virus used. In that regard, we can cite, for example, E1A, MLP, CMV, LTR-RSV, etc. promoters. Moreover, these expression
15 sequences can be modified by the addition of activator [or] regulatory sequences or sequences permitting tissue-specific expression. Indeed, it may be particularly advantageous to use specifically or for the most part active expression signals in vascular smooth muscle cells, so that the suicide gene is only expressed and its effect is only produced when the virus has actually infected a vascular smooth muscle cell.

20 A particular method of embodiment of the invention uses a defective recombinant adenovirus comprising a suicide gene under the control of a viral promoter, preferably selected from LTR-RSV or the CMV early promoter.

Thus, the present invention provides a particularly effective method for the treatment of
25 restenosis. Moreover, to further increase the efficacy and specificity of the treatment, the applicant has developed a method permitting local administration of recombinant adenoviruses at the sites to be treated. More particularly, this method is based on the use of an angioplasty balloon coated with a hydrophilic film (for example, a hydrogel) impregnated with the adenovirus, which can thus be applied specifically to the site to be treated, and permits local and effective release of the
30 adenoviruses into the cells to be treated. Moreover, the applicant has demonstrated that this method of administration permitted the infection of a high percentage of cells of the media

(up to 9.6%) which constitute the preferential target for the treatment of restenosis, while classic methods of administration (intravenous injection, for example) do not permit infection of these cells in a highly significant manner.

Thus, one object of the present invention pertains to a pharmaceutical composition comprising a defective recombinant adenovirus and a hydrogel. More specifically, the invention pertains to a composition comprising a defective recombinant adenovirus comprising a suicide gene and a hydrogel. The hydrogel used in the context of the present invention can be prepared from any biocompatible and non-cytotoxic polymer (homo or hetero). Such polymers have been described, for example, in application WO93/08845. Some of them, notably those obtained from ethylene and/or propylene oxide are commercial [products].

The treatment method of the invention advantageously consists, therefore, of introducing into the site to be treated, a composition comprising a hydrogel impregnated with recombinant adenoviruses. The hydrogel can be deposited directly on the surface of the tissue to be treated, for example, during a surgical intervention. Advantageously, the hydrogel [can] be introduced at the site to be treated by means of a catheter, for example, a balloon catheter, notably during angioplasty. In a particularly advantageous manner, the impregnated hydrogel is introduced to the treatment site by means of a balloon catheter, as described in the examples. In fact, the results presented in the examples demonstrate the efficacy of this system for the percutaneous transfer of genes into arterial walls.

The present invention will be more completely described using the following examples, which should be considered as illustrative and not limiting.

Figure Captions

Figure 1: Representation of pONT-tk vector

Figure 2: Representation of pRSV-tk vector

General molecular biology techniques

The classic methods used in molecular biology, such as plasmid DNA preparative extractions, centrifugation of plasmid DNA in cesium chloride gradient, electrophoresis on agarose or acrylamide gels, purification of DNA fragments by electroelution, extraction of proteins with phenol or phenol-chloroform, DNA precipitation in saline medium by ethanol or isopropanol, transformation in *Escherichia coli*, etc. are well known to those skilled in the art and are fully described in the literature [Maniatis T. et al, "Molecular Cloning, a Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F. M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology," John Wiley & Sons, New York, 1987].

Type pBR322, pUC plasmids and series M13 phages are of commercial origin (Bethesda Research Laboratories).

For ligations, DNA fragments can be separated according to size by agarose or acrylamide gel electrophoresis, extracted with phenol or by a phenol/chloroform mixture, precipitated with ethanol, then incubated in the presence of ligase DNA of the T4 phage (Biolabs) according to the recommendations of the supplier.

Filling of prominent 5' ends can be effected by the Klenow fragment of the DNA Polymerase I of *E. coli* (Biolabs) according to the specifications of the supplier. Destruction of prominent 3' ends is effected in the presence of phage T4 DNA Polymerase (Biolabs) used according to the recommendations of the manufacturer. The destruction of prominent 5' ends is effected by a treatment controlled by nuclease S1.

In vitro mutagenesis controlled by synthetic oligodeoxynucleotides can be effected according to the method developed by Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] using the kit distributed by Amersham.

Enzyme amplification of DNA fragments by the so-called PCR technique [Polymerase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. and Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] can be effected using a "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) according to the manufacturer's specifications.

Nucleotide sequences can be verified by the method developed by Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] using the kit distributed by Amersham.

Examples

Example 1. Construction of the Ad-LTR-TK vector bearing the TK gene under the control of the LTR promoter of the Roux sarcoma virus (LTR-RSV) (Figure 1).

This example describes the construction of a recombinant adenovirus comprising the thymidine kinase gene of the herpes simplex virus (tk) under the control of a viral promoter (LTR-RSV promoter). This adenovirus was constructed by homologous recombination between the defective adenovirus Ad-dl1324 and the plasmid pRSVtk bearing the tk gene under the control of the RSV promoter (Example 1.3). This plasmid was constructed from the plasmid pONTtk (Example 1.1), by substitution of the transactivable promoter by EBNA1 by the RSV promoter (Example 1.2).

1.1. Construction of the pONTtk plasmid

a) Construction of the p7tk1 plasmid

This example describes the construction of a plasmid containing the open reading phase of the tk gene of 1131 base pairs (ATG 114-116 and stop codon TGA 1242-1244), inserted into a cloning multisite.

The BglIII-NcoI fragment containing the thymidine kinase (tk) gene of the type 1 herpes simplex virus was isolated from the plasmid pHSV-106 (marketed by Gibco BRL), repaired by the action of the Klenow fragment, then inserted at the SmaI site of the plasmid pGEM7zf(+) (marketed by Promega). The SmaI and BglIII sites are destroyed during this step, the NcoI site is preserved.

The plasmid obtained was named p7tk1.

b) Construction of the pONT1 plasmid

This example describes the construction of a plasmid containing a chimeric promoter consisting of a sequence necessary for transactivation by the EBNA1 antigen and the TP1 promoter of the EBV.

The EcoRI(7315)-SmaI(8191) fragment of the EBV virus was isolated from the B95-8 strain. The complete sequence of the EBV virus was described by Baer et al. (Nature 310 (1984) 207). This fragment contains the sequences necessary for transactivation by the nuclear antigen 1 (EBNA1) (D. Reisman & B. Sugden, 1986, Molecular and Cellular Biology, Vol. 6 pp. 3838-3846). This fragment was then fused to the NruI(166 241)-PstI(166 559) fragment of EBV B95-8 (the PstI site was digested by the T4 polymerase), containing the TP1 promoter. The chimeric

promoter obtained in this manner was then inserted into the cloning multisite of the pBluescript II SK plasmid to generate the pONT1 plasmid.

c) Construction of the pONTtk plasmid

5 The pONTtk plasmid comprises the thymidine kinase gene of the herpes simplex virus (tk) cloned in the p7tk1 plasmid, under the control of the chimeric promoter EBNA1-RE/TP1 cloned in the pONT1 plasmid.

To construct this plasmid, the BamHI-XhoI fragment of pONT1 which contains the chimeric promoter transactivated by EBNA-1 and EBNA-2, and the XhoI-ClaI fragment of p7tk1 which
10 contains the tk open reading phase were cloned at the BamHI (478) and ClaI (4550) sites of plasmid pAd.RSVbgal. Plasmid pAd.RSVbGal contains, in the 5'->3' orientation,

- the PvuII fragment corresponding to the left end of adenovirus Ad5 comprising: the ITR sequence, the replication source, the encapsidation signals and the E1A amplifier;
- the gene coding for b-galactosidase under the control of the RSV (Roux sarcoma virus)
15 promoter,
- a second fragment of the Ad5 adenovirus genome, which permits the homologous recombination between plasmid pAd.RSVbGal and adenovirus d1324. The plasmid pAd.RSVbGal was described by Stratford-Perricaudet et al. (J. Clin. Invest. 90 (1992) 626).

All cloning sites are preserved. The plasmid obtained was named pONTtk.

20

1.2. Construction of plasmid pRSVtk

This plasmid was constructed from plasmid pONTtk (Example 1.1), by substitution of the transactivable promoter by EBNA1 by the RSV promoter. To do this, the RSV promoter was isolated in the form of a BamHI-SalI fragment from the plasmid pAd.RSV.βgal (Stratford-
25 Perricaudet et al., J. Clin. Invest. 90 (1992) 626), then cloned to the BamHI(478) and SalI(1700) sites of plasmid pONTtk. The resulting plasmid was named pRSVtk (Figure 1).

1.3 Construction of the recombinant adenovirus Ad-RSV-tk

The pRSVtk vector was linearized and cotransfected with a deficient adenoviral vector in
30 helper cells (line 293) bringing in *trans* the functions coded by E1 regions (E1A and E11B) of the adenovirus.

More specifically, adenovirus Ad-RSV-tk was obtained by homologous recombination *in vivo* between the mutant adenovirus Ad-dl1324 (Thimmappaya et al., Cell 31 (1982) 543) and the pRSVtk vector, according to the following protocol: plasmid pRSVtk, linearized by XmnI, and adenovirus Ad-dl1324, linearized by enzyme ClaI, were cotransfected into line 293 in the presence of calcium phosphate to permit homologous recombination. The recombinant adenoviruses regenerated in this manner were selected by plaque purification. After isolation, the DNA of the recombinant adenovirus was amplified in cell line 293, which produced a culture supernatant containing the unpurified recombinant defective adenovirus having a titer of approximately 10^{10} pfu/ml.

The viral particles were then purified by centrifugation on a cesium chloride gradient according to known methods (see notably, Graham et al., Virology 52 (1973) 456). The adenovirus Ad-RSV-tk can be stored at -80° in 20% glycerol.

Example 2: Activity of an adenovirus according to the invention in the presence of ganciclovir on cultured smooth muscle cells.

The activity of the adenovirus containing the TK gene prepared in Example 1 was tested on *in vitro* models of smooth muscle cells. To do this, smooth muscle cells isolated from rat and rabbit aorta were infected by the recombinant virus Ad-RSV-tk, and incubated in the presence of ganciclovir. The effect of the Ad-RSV-tk/ganciclovir combination on cellular viability was then confirmed by the MTT colorimetric test, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, according to the method described by Mosman (J. Immunol. Meth. 65 (1983) 55).

Example 3: Percutaneous arterial transfer of a recombinant adenovirus

This example describes the development of a particularly effective technique for percutaneous gene transfer. This technique is based on the use of a balloon catheter [coated] with hydrogel. The results presented show that, in a completely advantageous manner, this technique effectively permits the infection of certain preferred cell populations, notably for the treatment of restenosis.

This example was embodied by means of a defective recombinant adenovirus comprising the β -galactosidase gene of *E. coli* under the control of the LTR-RSV promoter and a nuclear localization signal. The construction of this adenovirus has been described notably in Stratford-Perricaudet et al., (J. Clin. Invest. 90 (1992) 626).

5 The experiments were carried out on New Zealand white rabbits anesthetized with acepromazine and maintained under phenobarbital. Gene transfer was carried out on the external iliac artery.

10 The adenovirus Ad-RSV. β -Gal ($1-2 \cdot 10^{10}$ pfu in 100 μ l of phosphate buffer) was deposited on a balloon catheter previously coated with hydrogel (Hydroplus, Mansfield Medical, Boston Scientific Corporation, Watertown, MA) (Riessen et al., Hum. Gene Ther. 4 (1993) 749). The catheter used is a balloon catheter, 2 cm long with a diameter between 2.5 and 3 mm. The catheter was then introduced, using a protective sleeve, into the right femoral artery. A pressure of one atmosphere was then applied, the catheter was then guided up to the external iliac artery where a pressure of 6 atmospheres was then applied to the balloon for 30 minutes. This experiment was carried out on 27 rabbits. Three to twenty-eight days after administration, the animals were sacrificed by pentobarbital overdose.

Transfer and expression of the gene in the arterial wall

20 The arteries of the sacrificed animals were isolated, and the expression of the β -galactosidase was detected by staining in the presence of X-gal according to the method of Sanes et al (EMBO J. 5 (1986) 3133). For each animal, at least two arterial segments were mounted on OCT (Miles Laboratories Inc. IL) for cryosection experiments, or coated with paraffin, cut into 6 μ m sections and counterstained with hematoxylin and eosin. Expression was considered positive only when a dark blue stain was observed in the nucleus. The results obtained clearly show that the arteries of the infected animals show the characteristic blue coloring of β gal. A microscopic analysis reveals that there is no residual intact endothelium, but that the continuity of the internal elastic lamina is preserved. The microscopic analysis also shows that the cells of the media were infected by the adenoviruses and express the transferred gene. More specifically, although in the case of administration by a double-balloon catheter, only 0.4% of the cells in the media were infected, 30 9.6% were [infected] when a hydrogel-coated catheter was used (see morphometric analysis

below). Moreover, the 9.6% was calculated in relation to the total thickness of the media, but in the superficial layers of the media 100% of the cells were infected. These results are well above the results obtained with double-balloon catheters, either by naked gene transfer or by means of liposomes. These experiments demonstrate that adenoviruses can constitute a particularly
 5 advantageous vector for the administration of suicide genes for the purpose of treating restenosis.

Morphometric Analysis

The efficacy of the transfer was determined on 7 treated rabbits. All of these animals received
 10 $5 \cdot 10^9$ pfu of adenovirus to infect an arterial segment 2 cm long, such that the multiplicity of infection was similar for each animal. For each transfected iliac artery, two serial segments 5 mm long were removed from the target area, and for each segment, at least three random sections were examined under the light microscope after staining with X-gal. On each section, the transfer efficacy was determined by the ratio of stained media cells to the total number of media cells. In
 15 total, more than $30 \cdot 10^3$ cells from arteries infected by adenoviruses (48 sections) were counted. The mean percentage of media cells infected is 4.02%, with values that may reach 9.6%. In the case of a transfer by double-balloon catheter, the mean percentage is only 0.18%.

Expression Kinetics

20 To determine the duration of the expression of the gene transferred by the adenoviruses according to the invention, a study of the expression of β -gal was conducted over time in 20 rabbits treated either by double-balloon catheter (10 animals), or by hydrogel-impregnated balloon catheter (10 animals). For each group, 2 animals were sacrificed on days 3, 7, 14, 21, and 28. The
 25 expression was detected by macroscopic and microscopic examinations of X-gal stained arteries as described above. The results obtained for each group show stable expression for 14 days, followed by a decrease after 21 days. No expression was detected at day 28. These results confirm the

transient effect of the vectors of the invention, which is particularly advantageous and suited to the treatment of restenosis.

Transfer and expression selectivity in arterial walls

5

In order to control possible dissemination of the injected adenoviruses to other tissues, in all animals sacrificed 3 days after injection, tissue samples from the liver, brain, testicles, heart, lung, kidney, and skeletal muscle as well as an arterial segment adjacent to the treated site, were obtained immediately after sacrifice. On each sample, gene transfer and expression were revealed by PCR (by means of probes directed against the gene coding for protein IX of the adenovirus and the lacZ gene) and histochemistry. The results obtained show that none of the samples removed from the animals treated by hydrogel coated balloon catheters showed any staining in the tissues tested. In the same manner, no virus could be detected by PCR in the samples tested, even when an optimized, extremely sensitive protocol of 45 amplification cycles was used.

10

These results demonstrate the efficacy of the method of administration according to the invention for delivering therapeutic genes in an extremely local manner.

15

CLAIMS

1. Use of a defective recombinant adenovirus comprising a suicide gene for the preparation of a pharmaceutical composition intended for the treatment of restenosis.

5

2. Use according to claim 1 characterized in that the suicide gene is selected among the thymidine kinase gene and the cytosine deaminase gene.

3. Use according to claim 1 characterized in that the suicide gene is the thymidine kinase gene of the human herpes virus (HSV-1 TK).

10

4. Use according to one of the preceding claims characterized in that the suicide gene is placed under the control of a promoter permitting its expression into the infected cells.

5. Use according to claim 4 characterized in that the promoter is selected from viral promoters, preferably the LTR-RSV and CMV promoter.

15

6. Use according to one of the preceding claims characterized in that the adenovirus comprises ITR, a sequence permitting encapsidation and gene suicide.

20

7. Use according to claim 6 characterized in that the adenovirus comprises ITR, a sequence permitting encapsidation [and] the suicide gene, and in which the E1 gene and at least one of the E2, E4, L1-L5 genes is non-functional.

8. Use according to one of the preceding claims characterized in that the adenovirus is an adenovirus of human origin, preferably selected from Ad2 and Ad5 serotypes.

25

9. Use according to one of claims 1 to 7 characterized in that the adenovirus is an adenovirus of animal origin, selected preferably from canine adenoviruses.

30

10. Use according to one of claims 1 to 9 characterized in that the adenovirus is impregnated in a hydrogel.

11. Use according to claim 10 characterized in that the hydrogel is deposited on a balloon catheter.

12. Pharmaceutical composition comprising a defective recombinant adenovirus impregnated in a hydrogel.

13. Pharmaceutical composition according to claim 12 characterized in that the defective recombinant adenovirus comprises a suicide gene.

14. Device for the percutaneous administration of genes characterized in that it comprises a balloon catheter coated with a hydrogel, the hydrogel being impregnated with a defective recombinant adenovirus comprising said gene.

CLAIMS

5 1. Pharmaceutical composition comprising a defective recombinant adenovirus impregnated
in a hydrogel.

 2. Pharmaceutical composition according to claim 1 characterized in that the defective
recombinant adenovirus comprises a suicide gene.

10

 3. Device for the percutaneous administration of genes characterized in that it comprises a
balloon catheter coated with a hydrogel, the hydrogel being impregnated with a defective
recombinant adenovirus comprising said gene.

15

CLAIMS

1. Pharmaceutical composition comprising a defective recombinant adenovirus comprising a
5 suicide gene, impregnated in a hydrogel.

2. Device for the percutaneous administration of genes characterized in that it comprises a
balloon catheter coated with a hydrogel, the hydrogel being impregnated with a defective
recombinant adenovirus comprising a suicide gene.

10

